

## REVENDICATIONS

5 1) Procédé d'obtention *in vitro* de cellules insulino-sécrétrices de mammifère, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) la préparation des tissus pancréatiques de mammifère à partir de pancréas préalablement prélevés,

10 b) la dissociation des tissus pancréatiques obtenus à l'étape (a) en cellules pancréatiques isolées,

c) éventuellement l'élimination des cellules endocrines des cellules pancréatiques isolées à l'étape (b)

d) l'induction de la dédifférenciation des cellules isolées à l'étape (b) en cellules précurseur canalaire,

e) l'induction de la rédifférenciation des cellules précurseurs canalaire obtenues à l'étape (d) en cellules insulino-sécrétrices.

20 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la dissociation des tissus pancréatiques à l'étape (b) est effectuée par digestion enzymatique.

25 3) Procédé selon l'une quelconque des revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'élimination de cellules endocrines à l'étape (c) est effectuée au moyen d'une centrifugation en gradient de densité.

30 4) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'élimination des cellules endocrines est effectuée par retrait de la fraction des cellules endocrines récupérées dans une gamme

de densités comprise entre 1,027 g/l et 1,104 g/l, de préférence entre 1,045 g/l et 1,097 g/l.

5) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les cellules exocrines dépourvues de cellules endocrines sont récupérées après centrifugation des cellules pancréatiques isolées à l'étape (b), dans le culot du gradient de densité.

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'élimination des cellules endocrines est effectuée au moyen d'un séparateur de cellules.

15) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que la dédifférenciation de l'étape (d) comprend les sous-étapes suivantes:

20) i) la mise en culture des cellules obtenues à l'étape (c) à une concentration cellulaire comprise entre  $1 \times 10^6$  cellules/ml et  $10 \times 10^6$  cellules/ml, de préférence entre  $2 \times 10^6$  cellules/ml et  $6 \times 10^6$  cellules/ml, dans un milieu de culture comprenant :

25) - du glucose à une concentration comprise entre 1g/l et 10 g/l, de préférence entre 2g/l et 5 g/l.

30) - éventuellement du sérum, choisi parmi le sérum de veau fœtal, du sérum bovin ou du sérum humain, à des concentrations supérieures à 8%, de préférence comprises entre 10% et 15%, final en volume.

35) - un mélange d'insuline, transferrine, sélénium utilisé à une concentrations comprise entre 0,2% et 3%, de préférence entre 1,0% et 2,5%,

40) - éventuellement des facteurs empêchant la croissance de fibroblastes à une concentration comprise

entre 20 µg/ml et 100 µg/ml, de préférence entre 30 µg/ml et 60 µg/ml,

- éventuellement des antibiotiques, des antifongiques,

pendant une durée comprise entre 4 à 9 jours, de préférence de 5 à 7 jours,

ii) la récupération des cellules précurseurs canalaires obtenues à l'étape (i).

8) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'induction de la rédifférenciation de l'étape (e) comprend les sous-étapes suivantes:

i) éventuellement le décollement des cellules précurseurs canalaires obtenues à l'étape (d)

ii) la mise en culture des cellules précurseurs canalaires obtenues à l'étape (i) à des concentrations cellulaires comprises entre  $3,5 \times 10^5$  cellules / $25\text{cm}^2$  et  $4 \times 10^6$  cellules/ $25\text{cm}^2$ , de préférence de  $7 \times 10^5$  cellules/ $25\text{cm}^2$  à  $3 \times 10^6$  cellules/ $25\text{cm}^2$ , dans un milieu de culture comprenant:

- du glucose à des concentrations comprises entre 1g/l et 10 g/l, de préférence entre 2 g/l et 5 g/l.

- éventuellement du sérum, choisi parmi le sérum de veau fœtal, du sérum bovin ou du sérum humain, à des concentrations supérieures à 2,5%, de préférence comprises entre 5% et 15%, final en volume.

- éventuellement un mélange d'insuline, transferrine, sélénium à des concentrations comprises entre 0,2% et 5 %, de préférence entre 0,5% et 2%,

- éventuellement des antibiotiques et des antifongiques,

- éventuellement en présence d'une matrice,

pendant une durée comprise entre 12 heures et 36 heures,

iii) le retrait dudit milieu de culture, et des cellules non adhérentes éventuellement présentes,

iv) la mise en culture des cellules obtenues à l'étape (iii) dans un milieu de culture tel que celui utilisé à l'étape (i), comprenant éventuellement des facteurs de croissance,

pendant une durée comprise entre 4 et 12 jours, de préférence entre 5 et 10 jours,

pour obtenir des cellules endocrines insulino-sécrétrices, et

v) la récupération des cellules insulino-sécrétrices obtenues à l'étape (iv).

9) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le décollement des cellules précurseurs canalaires obtenues à sous-étape (i) de l'étape (e) est effectué avec de la trypsine/EDTA, à des concentrations comprises entre 0,01% et 0,1% de trypsine, de préférence de 0,015 et 0,03 et d'EDTA comprises entre 0,1 mM et 1 mM de préférence entre 0,25mM et 0,75mM.

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la matrice mis en œuvre pour la culture des cellules à la sous-étape (ii) de l'étape (e) est choisie parmi le collagène type IV, 804G, le collagène type I, le Matrigel.

11) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les tissus pancréatiques préparés à l'étape (a) ont été obtenus à partir d'un prélèvement préalable d'un fragment du pancréas d'un adulte humain en état de mort cérébral.

12) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les tissus pancréatiques préparés à l'étape (a) ont été obtenus à partir d'un prélèvement préalable d'un fragment d'un pancréas d'un patient vivant atteint d'une pathologie pancréatique.

13) Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que les tissus pancréatiques préparés à l'étape (a) ont été obtenus à partir d'un prélèvement préalable d'un fragment d'un pancréas d'un patient vivant atteint d'un diabète.

14) Préparation cellulaire susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 caractérisée en ce qu'elle comporte une concentration cellulaire comprise entre  $1 \times 10^6$  cellules/ml et  $10 \times 10^6$  cellules/ml, de préférence entre  $2 \times 10^6$  cellules/ml et  $6 \times 10^6$  cellules/ml

15) Utilisation d'une préparation cellulaire selon la revendication 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour le traitement des pathologies pancréatiques

16) Utilisation selon la revendication 15 pour le traitement du diabète.

17) Pancréas bioartificiel, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules insulino-sécrétrices susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, mises en culture dans une matrice.

18) Pancréas bioartificiel, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules insulino-sécrétrices susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, mises en culture dans une matrice.

10